



Doctoral Thesis

Serum and Dried Blood Spot Thyroglobulin as a Novel Biomarker of Iodine Status in Pregnancy

Author(s):

Stinca, Sara

Publication Date:

2016

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010786721> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 23730

**SERUM AND DRIED BLOOD SPOT THYROGLOBULIN AS A NOVEL
BIOMARKER OF IODINE STATUS IN PREGNANCY**

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

SARA STINCA

MSc in Food Science, ETH Zurich

born on March 22, 1986
citizen of Losone TI, Switzerland

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. med. Michael B. Zimmermann, examiner
Dr. Maria Andersson, co-examiner
Prof. Dr. med. Ulla Feldt-Rasmussen, co-examiner

2016

SUMMARY

Background

Despite progress to control iodine deficiency disorders (IDD) through salt iodization, many high-income and low-income countries remain mildly iodine-deficient. The recommended iodine exposure biomarker in populations is the urinary iodine concentration (UIC). A promising functional biomarker is serum or dried blood spot (DBS) thyroglobulin (Tg). Tg is a thyroid-specific protein and a storage and synthesis site for thyroid hormones. Tg is a more sensitive functional biomarker of iodine nutrition compared with thyroid-stimulating hormone (TSH) or thyroid hormones, and reflects subtle changes in iodine nutrition over a period of weeks to months. Serum and DBS-Tg concentrations are elevated both during iodine deficiency (ID) and iodine excess. The World Health Organization (WHO) recommends DBS-Tg for monitoring iodine status in school-aged children. DBS-Tg correlates well with UIC and thyroid size, and can be used in conjunction with these indicators in monitoring iodine status in populations.

The iodine requirement during pregnancy is increased due to: 1) an increase in maternal thyroxine (T₄) production to maintain maternal euthyroidism and transfer thyroid hormone to the fetus early in the first trimester, before the fetal thyroid is functioning; 2) iodine transfer to the fetus, particularly in later gestation; and 3) a probable increase in renal iodine clearance. Therefore, biomarkers of thyroid status during pregnancy would be useful to assess iodine nutrition, particularly because iodine requirements and UIC reference ranges during pregnancy remain uncertain. Tg could be a valuable biomarker of iodine nutrition during pregnancy, but its performance in populations with varying iodine status is still unclear and no reference ranges are available. Limited data suggest Tg may be modestly elevated during pregnancy, in both iodine-deficient and iodine-sufficient women, possibly due to increased thyroid activity to meet increased thyroid hormone requirements. Tg antibodies (TgAb) can confound individual assessment of Tg in clinical monitoring of thyroid disorders. However, there are no data on whether co-measurement of TgAb along with Tg is necessary in studies of pregnant women to define population iodine status.

It is critical that the increased maternal iodine requirement is met, because ID early in the human life cycle -the “first 1000 days”- can irreversibly impair brain development, cause neurocognitive impairment and increase infant mortality. Pregnant and lactating women are at high risk for ID because their iodine requirements are increased by ~40% compared to pre-pregnancy. Infants are also vulnerable because their thyroidal iodine stores are small, and thyroxine turnover along with iodine requirements per kg body weight are higher than at any other age. In countries with limited resources and health infrastructure, better understanding of the impact of ID during this period could improve program delivery and prioritize interventions.

Research goals

The overall aims of this thesis were to: 1) develop and validate new, low-cost, serum and DBS ELISA assays to assess Tg concentrations and monitor iodine nutrition status and thyroid function (*Manuscript 1*); 2) establish a reference range for DBS-Tg in iodine-sufficient pregnant women, test the DBS-Tg reference range in pregnant women with a wide range of iodine intakes and determine if co-measurement of DBS-TgAb along with DBS-Tg is necessary in population studies of iodine status in pregnant women (*Manuscript 2*); 3) compare the prevalence of thyroid hypofunction among women of reproductive age, pregnant women, lactating women and their young infants in an area of moderate-to-severe ID (*Manuscript 3*).

Experiments

In this project, we developed and validated new serum and DBS-Tg assays to assess Tg concentrations. Then, we conducted a multi-center cross-sectional study to establish and test DBS-Tg reference range in pregnant women. Finally, we conducted a comparative study in moderate-to-severe ID women of reproductive age, pregnant women, lactating women and infants in order to assess the prevalence of thyroid hypofunction.

Development and validation of new serum and DBS-Tg assays (Manuscript 1)

Serum and DBS samples were measured from healthy pregnant women (n=424) with the new assays, as well as the Immulite 2000 (Siemens), including TgAb positive (n=150) and TgAb negative (n=274) women. DBS-Tg stability was tested over 15 weeks of storage

at -20°C. Within-subject variability was evaluated over four weeks in four healthy adults. Intra-assay and inter-assay variability was 4.4-7.3% and 10.1-12.9% for the new serum Tg assay, and 7.6-12.3% and 7.6-16.5% for the DBS-Tg assay. Correlation between the two serum methods was high ($r=0.68$, $p<0.01$). Assay performance in all women and those TgAb negative was comparable. Correlation between the new serum Tg assay and the DBS-Tg assay was high ($r=0.78$, $p<0.01$), and agreement expressed as a function of the average Tg concentration for the two methods (X) was $0.59X-4.59$ $\mu\text{g/L}$. DBS-Tg was stable for 15 weeks stored at -20°C. Within-subject variability in DBS-Tg was 21.1%.

DBS-Tg reference range in pregnant women (Manuscript 2)

We conducted a cross-sectional study in pregnant women in 11 countries ($n=3870$) with varying ethnicity and iodine intakes ranging from deficient to more-than-adequate. To define the DBS-Tg reference range we included euthyroid, TgAb negative women ($n=599$) from 3 countries with sufficient iodine intakes. In the reference population, median DBS-Tg (95% CI) was 9.2 (8.7-9.8) $\mu\text{g/L}$ and was not significantly different between trimesters; the reference range was 0.3-43.5 $\mu\text{g/L}$. Over a range from severe deficiency to near excess intake, Tg concentrations showed a U-shaped curve, median Tg values were significantly higher in iodine-deficient pregnant women than in iodine-sufficient pregnant women ($p<0.001$) and the percentage of elevated Tg was significantly higher in populations with iodine-deficient or more-than-adequate intakes ($p<0.05$). The overall prevalence of TgAb positivity was 18.5%, but within countries, median DBS-Tg and the presence of elevated DBS-Tg did not significantly differ between all women and those who were TgAb negative.

Comparative study to assess the effects of moderate-to-severe ID on thyroid function (Manuscript 3)

We conducted a cross-sectional survey in Morocco, where we measured spot UIC, TSH and total or free T4 in the women of reproductive age ($n=156$), pregnant women ($n=245$), lactating women ($n=239$), and infants ($n=239$). Women of reproductive age, pregnant women and lactating women had median (IQR) UICs of 40.8 (29.4-63.4), 31.5 (16.7-57.6) and 35.2 (19.3-62) $\mu\text{g/L}$, and the prevalence of hypothyroidism and hypothyroxinemia was low: only 1.9%, 0% and 0.4%, and 14.1%, 10.6% and 12.1%, respectively. Among infants median UIC was 73 (27.5-157) $\mu\text{g/L}$ ($p<0.001$ vs. all other groups), and, in contrast to the women, the

prevalence of hypothyroidism and hypothyroxinemia was high: 2.9% and 39.7% ($p < 0.001$ vs. all other groups).

Conclusions

This thesis contributes to the deepening of the understanding of Tg changes during pregnancy under varying iodine status. Our findings suggest that the measurement of DBS-Tg concentration together with median UIC represents the best functional biomarkers to evaluate the iodine status and iodine intake in pregnant women. Furthermore, this thesis demonstrates that in area of moderate-to-severe ID the young infants are the most exposed group at risk of thyroid hypofunction.

Manuscript 1: The new low-cost serum and DBS-Tg assays (~US\$1-1.5) perform well over a wide range of Tg concentrations, and the field-friendly DBS assay may be particularly useful in population studies of iodine nutrition.

Manuscript 2: In pregnant women, DBS-Tg is a sensitive biomarker of iodine status, and our data suggest that a DBS-Tg reference range of 0.3-43.5 $\mu\text{g/L}$ and a median DBS-Tg $\approx 10 \mu\text{g/L}$ indicate iodine sufficiency. Concurrent measurement of TgAb does not appear necessary to assess population iodine status in pregnant women.

Manuscript 3: In an area of moderate-to-severe ID, the prevalence of thyroid hypofunction is ≈ 4 -fold higher in young infants than in pregnant and lactating women. Based on these findings, we suggest starting supplementation programs in this population with priority given to increase iodine intakes in young infants.

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund

Trotz Fortschritten in der Kontrolle von Jodmangel-Erkrankungen durch die Anreicherung von Salz mit Jod, bleibt der Jodstatus in vielen Industrie- und Entwicklungsländer mangelhaft. Der empfohlene Biomarker für die Jodaufnahme von Bevölkerungsgruppen ist die Jodkonzentration im Urin (UIC). Ein vielversprechender funktioneller Biomarker des Jodstatus ist Thyreoglobulin (Tg) in Serum oder in getrockneten Blutstropfen. Tg ist ein Schilddrüsen-spezifisches Protein und dient der Speicherung und Synthese von Schilddrüsenhormonen. Im Vergleich zum Schilddrüsen-stimulierenden Hormon (TSH) und zu den Schilddrüsenhormonen ist Tg ein empfindlicherer funktioneller Biomarker und reflektiert feine Veränderungen des Jodstatus während Wochen oder Monaten. Die Tg-Konzentration im Serum und in getrockneten Blutstropfen ist sowohl bei Jodmangel als auch bei übermässigem Jodkonsum erhöht. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) empfiehlt die Messung von Tg in getrockneten Blutstropfen um den Jodstatus in Schulkindern zu überwachen. Tg in getrockneten Blutstropfen korreliert gut mit der Jodkonzentration im Urin sowie der Grösse der Schilddrüse und kann in Verbindung mit diesen Indikatoren genutzt werden, um den Jodstatus in Bevölkerungsgruppen zu überwachen.

Der Jodbedarf während der Schwangerschaft ist erhöht durch: 1) einen Anstieg der mütterlichen Thyroxin (T4)-Produktion um die normale Funktion der Schilddrüse aufrecht zu erhalten und um den Fötus im frühen ersten Trimester bevor die Funktion der Schilddrüse einsetzt mit Schilddrüsenhormonen zu versorgen; 2) den Transfer von Jod zum Fötus, speziell gegen Ende der Schwangerschaft; und 3) einen möglichen Anstieg der Ausscheidung von Jod über den Urin. Weil sowohl der Jodbedarf als auch der Referenzbereich für die Jodkonzentration im Urin während der Schwangerschaft fraglich sind wären Biomarker die den Zustand der Schilddrüse während der Schwangerschaft abbilden nützlich um den Jodstatus von schwangeren Frauen zu beurteilen. Die Tg-Konzentration könnte daher ein wertvoller Biomarker des Jodstatus in der Schwangerschaft sein. Allerdings bleibt die Aussagekraft dieses Markers in Bevölkerungen mit verschiedenem Jodstatus unklar und es gibt keine Referenzbereiche. Vorhandene Daten deuten an, dass Tg in der Schwangerschaft, in Frauen mit Jodmangel und guter Jodversorgung, eventuell leicht erhöht ist, vielleicht durch einen

Anstieg der Aktivität der Schilddrüse um den gesteigerten Bedarf an Schilddrüsenhormonen zu decken. Tg-Antikörper (TgAb) können die individuelle Beurteilung von Tg in der klinischen Überwachung von Schilddrüsenerkrankungen beeinflussen. Nichtsdestotrotz gibt es keine Daten darüber, ob die simultane Messung von Tg und Tg-Antikörpern in schwangeren Frauen notwendig ist, um den Jodstatus in dieser Bevölkerungsgruppe zu bestimmen.

Es ist entscheidend, dass der gesteigerte Jodbedarf Schwangerer gedeckt wird, denn Jodmangel im frühen Lebenszyklus des Menschen -in den "ersten 1000 Tagen"- kann die Entwicklung des Gehirns irreversibel schädigen, neurokognitive Beeinträchtigungen verursachen und die Säuglingssterblichkeit erhöhen. Schwangere und stillende Frauen haben ein hohes Risiko für Jodmangel, da ihr Bedarf um $\approx 40\%$ höher ist als vor der Schwangerschaft. Säuglinge sind auch gefährdet, weil ihr Jodvorrat in der Schilddrüse klein ist, und der Umsatz von T4 und der Jodbedarf pro Kg Körpergewicht höher ist als in jedem anderen Alter. In Ländern mit limitierten wirtschaftlichen Möglichkeiten und limitierter Gesundheitsversorgung könnte das bessere Verständnis der Konsequenzen von Jodmangel im Säuglingsalter helfen, Massnahmen gegen Jodmangel zu liefern und diese zu priorisieren.

Forschungsziele

Die Ziele dieser Dissertation waren: 1) ein neues, kostengünstiges, antikörperbasiertes Verfahren (ELISA) zur Messung von Tg-Konzentrationen in Serum und in getrockneten Blutstropfen zu entwickeln und zu validieren um damit den Jodstatus und die Funktionalität der Schilddrüse zu überwachen (*Manuskript 1*); 2) einen Referenzbereich für Tg in getrockneten Blutstropfen in schwangeren Frauen mit guter Jodversorgung festzulegen, diesen in Schwangeren mit unterschiedlichem Jodstatus zu testen, und herauszufinden, ob die simultane Messung von Tg und Tg-Antikörpern in getrockneten Blutstropfen notwendig ist, um die Jodaufnahme schwangerer Frauen zu bestimmen (*Manuskript 2*); 3) die Häufigkeit von Schilddrüsenunterfunktion in Frauen im gebärfähigen Alter, Schwangeren und Stillenden und deren Säuglingen in einem Gebiet mit mässig bis schlechtem Jodmangel zu vergleichen (*Manuskript 3*).

Versuche

Im Rahmen dieses Projekts entwickelten und validierten wir ein neues Verfahren, um die Konzentration von Tg in Serum und in getrockneten Blutstropfen zu messen. Dann führten

wir eine multizentrische Querschnittstudie durch um einen Referenzbereich für Tg-Konzentrationen in getrockneten Blutstropfen in Schwangeren festzulegen und zu überprüfen. Schlussendlich führten wir noch eine Vergleichsstudie in Frauen im gebärfähigen Alter, Schwangeren und Stillenden und deren Säuglingen mit mässigem bis schlechtem Jodmangel durch, um die Häufigkeit von Schilddrüsenunterfunktion zu bestimmen.

Entwicklung und Validierung neuer Verfahren um die Konzentration von Tg in Serum und getrockneten Blutstropfen zu messen (Manuskript 1)

Getrocknete Blutstropfen und Serum-Proben gesunder schwangerer Frauen (n=424), darunter Tg-Antikörper-positive (n=150) und -negative (n=274), wurden mit dem neuen Verfahren und mit Immulite 2000 (Siemens) gemessen. Die Stabilität von Tg in getrockneten Blutstropfen wurde über 15 Wochen bei einer Lagerung bei -20°C getestet. Die Variabilität innerhalb eines Individuums wurde während vier Wochen in vier gesunden Erwachsenen bestimmt. Die Interassay- und Intraassay-Variation war 4.4-7.3% und 10.1-12.9% für das neue Verfahren mit Serum-Tg und 7.6-12.3% und 7.6-16.5% für das neue Verfahren mit Tg in getrockneten Blutstropfen. Die Korrelation zwischen dem neuen Serum-Tg Verfahren und Immulite 2000 war hoch (r=0.68, p<0.01). Die Resultate aller Frauen waren vergleichbar mit den Tg-Antikörper Negativen. Die Korrelation zwischen dem neuen Serum-Tg Verfahren und dem Verfahren für Tg in getrockneten Blutstropfen war ebenfalls hoch (r=0.78, p<0.01), und die Übereinstimmung, ausgedrückt als Funktion der durchschnittlichen Tg-Konzentration beider Methoden (X) war 0.59X-4.59 µg/L. Tg in getrockneten Blutstropfen war für 15 Wochen bei -20°C stabil. Die intra-individuelle Variabilität war 21.1%.

Referenzbereich für Tg in getrockneten Blutstropfen schwangerer Frauen (Manuskript 2)

Wir führten eine Querschnittsstudie in schwangeren Frauen in 11 Ländern (n=3870) unterschiedlicher Volkszugehörigkeit und mit Jodaufnahmen von mangelhaft bis mehr als ausreichend durch. Um den Referenzbereich für Tg in getrockneten Blutstropfen festzulegen, wurden Tg-Antikörper-negative schwangere Frauen mit normaler Schilddrüsenfunktion (n=599) aus drei Ländern mit guter Jodversorgung berücksichtigt. In dieser Referenzbevölkerung war der Median (95% KI) der Tg-Konzentration in getrockneten Blutstropfen 9.2 (8.7-9.8) µg/L und variierte zwischen den Trimestern nicht wesentlich; der Referenzbereich war 0.3-43.5 µg/L. In einem Bereich von schwerem Jodmangel bis zu

beinahe übermässiger Jodaufnahme folgten die Tg-Konzentrationen einer U-förmigen Kurve. Der Median in Schwangeren mit Jodmangel war signifikant höher als in jenen mit adäquater Jodversorgung ($p < 0.001$) und der Anteil erhöhter Tg-Werte war bedeutend höher in Bevölkerungsgruppen mit Jodmangel oder übermässiger Jodzufuhr ($p < 0.05$). Insgesamt war das Vorkommen von Tg-Antikörpern 18.5%, dennoch waren innerhalb der Länder die Mediane der Tg-Konzentration in getrockneten Blutstropfen und die Anzahl erhöhter Werte aller Frauen nicht signifikant unterschiedlich von denen der Tg-Antikörper negativen Frauen.

Vergleichsstudie um die Auswirkungen mittleren bis schweren Jodmangels auf die Funktionalität der Schilddrüse zu untersuchen (Manuskript 3)

Wir führten eine Querschnittsstudie in Marokko durch und untersuchten die Jodkonzentration (UIC) in Spot-Urinproben und die Menge an TSH und totalem oder freiem T4 in Frauen im gebärfähigen Alter ($n=156$), Schwangeren ($n=245$), Stillenden ($n=239$) und deren Säuglingen ($n=239$). Die Jodkonzentrationen im Urin der Frauen im gebärfähigen Alter, der Schwangeren und der Stillenden hatten Mediane (Interquartilsabstand) von 40.8 (29.4-63.4), 31.5 (16.7-57.6) und 35.2 (19.3-62) $\mu\text{g/L}$. Das Vorkommen von Schilddrüsenunterfunktion und Hypothyroxinämie war gering: nur 1.9%, 0% und 0.4%, respektive 14.1%, 10.6% und 12.1%. Der Median der Jodkonzentration im Urin der Säuglinge war 73 (27.5-157) $\mu\text{g/L}$ ($p < 0.001$ vs. alle anderen Gruppen) und verglichen mit den Frauen war das Vorkommen von Schilddrüsenunterfunktion und Hypothyroxinämie hoch: 2.9% und 39.7% ($p < 0.001$ vs. alle andern Gruppen).

Schlussfolgerungen

Diese Doktorarbeit führt zur Vertiefung des Verständnisses der Veränderungen der Tg-Konzentration während der Schwangerschaft bei verschiedenem Jodstatus. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Tg-Konzentration in getrockneten Blutstropfen zusammen mit dem Median der Jodkonzentration im Urin die besten funktionellen Biomarker sind um den Jodstatus und die Jodaufnahme in Schwangeren zu beurteilen. Zusätzlich zeigt diese Dissertation, dass, in Gebieten mit mittlerem bis schwerem Jodmangel, Neugeborene das höchste Risiko einer Schilddrüsenunterfunktion tragen.

Manuskript 1: Die neu entwickelten, preisgünstigen (~US\$1-1.5) Verfahren um Tg in Serum und getrockneten Blutstropfen zu messen, liefern über eine grosse Breite an Tg-Konzentrationen gute Resultate. Vor allem das Feldversuch-freundliche Verfahren für die getrockneten Blutstropfen könnte in Bevölkerungsstudien über Jodernährung nützlich sein.

Manuskript 2: Tg in getrockneten Blutstropfen ist ein sensitiver Biomarker des Jodstatus von Schwangeren. Unsere Resultate deuten darauf hin, dass ein Tg-Wert innerhalb des Referenzbereiches von 0.3-43.5 µg/L und eine mediane Tg-Konzentration von ≈10 µg/L auf ausreichende Jodversorgung hinweisen. Eine gleichzeitige Bestimmung von Tg-Antikörpern scheint nicht notwendig zu sein um die Jodaufnahme schwangerer Frauen zu ermitteln.

Manuskript 3: In einem Gebiet mit mittlerem bis schwerem Jodmangel ist das Vorkommen von Schilddrüsenunterfunktion in Neugeborenen ≈4-fach höher als in Schwangeren und Stillenden. Basierend auf diesen Resultaten schlagen wir vor, Supplementierungsprogramme in dieser Gruppe zu beginnen um die Jodaufnahme zu erhöhen.